

党参总皂苷对人肝癌 SMMC-7721 细胞的抑制作用及其机制

方志娥*, 李艳艳, 杨雅淋, 冷 静*(重庆市中医院, 重庆 400021)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)10-1356-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.10.19

摘要 目的:研究党参总皂苷(TSC)对人肝癌 SMMC-7721 细胞的抑制作用,并初步探讨其作用机制。方法:采用 MTT 法检测 0、100、200、400、600、800、1 000、1 200、1 400、1 600、1 800、2 000 mg/L 的 TSC 作用于 SMMC-7721 细胞 72 h 后的细胞活力,并计算生长抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀);采用流式细胞仪检测 911.0 mg/L 的 TSC 作用于 SMMC-7721 细胞 24、48、72 h 后的细胞凋亡情况并计算凋亡率;采用酶标仪检测 0(空白对照)、200、400、800、1 000 mg/L 的 TSC 作用于 SMMC-7721 细胞 72 h 后半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)、Caspase-8、Caspase-9 活性,并采用双抗体夹心酶联免疫法检测其 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、p53 蛋白表达。结果:100~2 000 mg/L TSC 可抑制 SMMC-7721 细胞的增殖,且与 TSC 给药浓度呈正相关,其 IC₅₀ 为 911.0 mg/L;911.0 mg/L 的 TSC 作用于细胞 24、48、72 h 的凋亡率分别为 21.10%、30.20%、41.10%。与空白对照比较,200、400、800、1 000 mg/L 的 TSC 能增强细胞中 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 活性与 p38MAPK、p53 蛋白表达,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),且与给药质量浓度呈正相关。结论:TSC 能有效抑制 SMMC-7721 细胞增殖,其机制可能是通过上调 Caspase-8、Caspase-9 活性与 p38MAPK、p53 蛋白表达,最终激活 Caspase-3,从而诱导细胞凋亡。

关键词 党参总皂苷;细胞凋亡;人肝癌 SMMC-7721 细胞;机制

Inhibitory Effects and Mechanism of Total Saponins from *Codonopsis pilosula* on Human Hepatocellular Carcinoma SMMC-7721 Cells

FANG Zhi-e, LI Yan-yan, YANG Ya-lin, LENG Jing (Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effects of total saponins from *Codonopsis pilosula* (TSC) on human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells and to explore their mechanism of action. METHODS: MTT method was used to determine cell viability after the TSC with concentrations of 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1 000, 1 200, 1 400, 1 600, 1 800 and 2 000 mg/L had acted on SMMC-7721 cells for 72 h, and the growth inhibition rates and median inhibitory concentration (IC₅₀) were calculated. The flow cytometry was employed to determine the apoptosis after the TSC with the concentration of 911.0 mg/L had acted on SMMC-7721 cells for 24, 48 and 72 h, and the apoptosis rates were calculated. The microplate reader and double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay were adopted to determine the activities of Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 as well as p38MAPK and p53 protein expression after the TSC with concentrations of 0 (blank control), 200, 400, 800 and 1 000 mg/L had acted on SMMC-7721 cells for 72 h. RESULTS: The TSC with concentrations of 100-2 000 mg/L could inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells, and it had a positive correlation with the concentration; and the IC₅₀ was 911.0 mg/L. The apoptosis rates were 21.10%, 30.20% and 41.10% respectively after the TSC with the concentration of 911.0 mg/L had acted on cells for 24, 48 and 72 h. Compared with blank control, the TSC with concentrations of 200, 400, 800 and 1 000 mg/L could enhance the protein expression of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, p38MAPK and p53 in cells, showing a positive correlation with the concentration. There was significant difference ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: TSC can effectively inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells by the mechanism of increasing the protein expression of Caspase-8, Caspase-9, p38MAPK and p53 to activate Caspase-3 and induce apoptosis.

KEYWORDS Total saponins from *Codonopsis pilosula*; Apoptosis; Human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells; Mechanism

[13] Guo J, Gao X, Su L, *et al.* Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(31): 8 010.

[14] Yun Jin, Song Y, Zhu X, *et al.* Goblet cell-targeting nanoparticles for oral insulin delivery and the influence of mu-

cus on insulin transport[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(5): 1.

[15] Chen Y, Zhu X, Zhang X, *et al.* Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(9): 1 650.

[16] Gao JQ, Lv Q, Li LM, *et al.* Glioma targeting and blood-brain barrier penetration by dual-targeting doxorubicin liposomes[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(22): 5 628.

(收稿日期:2014-08-19 修回日期:2015-01-19)

(编辑:张 静)

* 中药师, 硕士。研究方向: 中药药物分析。电话: 023-67063732。E-mail: fangzhe03@163.com

通信作者: 副主任中药师, 博士。研究方向: 中药新药研究。电话: 023-67063732。E-mail: ljleijing@sina.com

目前,原发性肝癌在全球的发病率都呈迅猛的上升趋势^[1],世界卫生组织发表的《全球癌症报告2014》显示,中国肝癌的新增病例和死亡人数均居世界首位^[2]。在肝癌的综合治疗中,从中药中寻找高效低毒的抗癌药物,是当今药物研究的目标之一。党参(*Codonopsis pillosula*)为桔梗科(Campanulaceae)多年生草本植物党参、素花党参、川党参及其同属多种植物的根^[3-4],是我国传统的补益药,具有补中益气、健脾益肺、提高人体免疫力的作用^[5-6]。党参总皂苷(Total saponins of *C. pillosula*, TSC)是党参中重要生物活性物质之一^[7-8],其通过上调B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)蛋白表达和下调Bax蛋白的表达,能够抑制肾细胞的凋亡^[9]。

轮叶TSC对人肝癌HepG2细胞的生长具有抑制作用^[10-11],其中党参皂苷D在体外可明显抑制HepG2细胞生长,并能干扰癌细胞DNA合成代谢;党参皂苷L1是治疗中风病急性期的主要成分,能显著降低神经细胞凋亡率及坏死率^[12-13]。目前对TSC抗肿瘤的研究文献报道不多,其抗肿瘤药有效物质基础亦不明确。本研究通过考察TSC对体外人肝癌SMMC-7721细胞增殖活性和细胞凋亡的影响,为TSC抗肿瘤新药的开发及其在临床上的应用提供试验基础。

1 材料

1.1 仪器

Forma Series II型培养箱(美国Thermo Scientific公司); Model 550酶联分析仪(美国Bio-Rad公司);FACSCalibur型流式细胞仪(美国Becton-Dickinson公司);Allegra-64R型高速离心机(美国Beckman Coulter公司);YJ-875SA型超净工作台(苏州净化设备有限公司);XW-80A型漩涡震荡仪(上海医科大学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

TSC(重庆医科大学实验中心,含量:96.5%);达尔伯克改良伊格格(DMEM)高糖培养基、胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司;Annexin V/FITC细胞凋亡检测盒和半胱氨酸蛋白酶3(Caspase-3)、Caspase-8、Caspase-9活性检测试剂盒均为上海碧云天生物技术公司产品;人p53和p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(美国RD公司);MTT(美国Sigma公司)。

1.3 细胞

SMMC-7721细胞由重庆医科大学药理实验室提供。

2 方法

2.1 SMMC-7721细胞培养

SMMC-7721细胞用含10%灭活FBS、100 u/ml青霉素、100 u/ml链霉素的DMEM培养液,在37℃、5%CO₂、饱和湿度的恒温培养箱中培养。

2.2 细胞抑制率的测定

收集对数生长期SMMC-7721细胞,用0.25%胰蛋白酶消化后,用含10%FBS的培养液配制成 1×10^5 ml⁻¹的细胞悬液,接种在96孔培养板中,每孔200 μl,置于含5% CO₂的培养箱在37℃静置培养24 h后,分别加入100、200、400、600、800、1 000、1 200、1 400、1 600、1 800、2 000 mg/L的TSC;同时设立空白对照

(未加TSC)。每个质量浓度设5个复孔,培养72 h后,每孔加入200 μl MTT,37℃静置培养4 h,弃培养液,再加入200 μl 二甲基亚砷(DMSO),振荡10 min后,以酶联分析仪于490 nm波长处测定各孔的吸光度(A)。计算抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀),抑制率(%)=(1-试验孔A/空白对照A)×100%。

2.3 细胞凋亡率的测定

收集对数生长期SMMC-7721细胞,取细胞密度为 2×10^5 ml⁻¹的细胞悬液接种于6孔板中,每孔加入911.0 mg/L的TSC各1 ml,置于5% CO₂、37℃湿化孵箱中分别培养24、48、72 h,每时间点设3个复孔。分别收集细胞,离心,按照检测试剂盒的要求进行操作,采用流式细胞仪测定各时间点细胞的凋亡率。

2.4 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9活性的检测

收集对数生长期SMMC-7721细胞,预处理后接种于6孔板,每孔 2×10^6 个细胞,每孔分别加入200、400、800、1 000 mg/L的TSC各0.5 ml;同时设立空白对照(未加TSC)。每个质量浓度设3个平行样本,置于37℃、5% CO₂条件下培养72 h后,按Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9活性检测试剂盒要求操作,以酶联分析仪于405 nm波长处测定各组细胞的A。A水平高低代表酶活性强度。

2.5 p38MAPK和p53蛋白的检测

采用双抗体夹心ELISA法,收集对数生长期SMMC-7721细胞,将 2×10^7 个接种于75 cm²的培养皿中,24 h后,加入200、400、800、1 000 mg/L的TSC;同时设立空白对照(未加TSC,换成新鲜培养液)。继续培养12 h,取细胞 $1 000 \times g$ 离心20 min,除去杂质及细胞碎片。取清液加入到经链霉素和生物素化p53和p38MAPK抗体预先包被的微孔板中,加入抗p53和p38MAPK过氧化物酶(1:15)室温孵育2 h,用洗涤缓冲液洗板5次,每次1 min,加入过氧化物酶底物液,室温孵育10~20 min,加入终止液,室温反应1 min,测定450 nm波长处的A。A水平高低代表蛋白表达强度。

2.6 统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析,样本均数的比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞抑制率的测定结果

与空白对照比较,100、200、400、600、800、1 000、1 200、1 400、1 600、1 800、2 000 mg/L的TSC作用于细胞后A均增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。随着TSC加入质量浓度的增加,细胞的A值逐渐减小,细胞抑制率逐渐增加,表明TSC对SMMC-7721细胞的抑制作用与给药浓度呈正相关。TSC对SMMC-7721细胞增殖的影响见表1。

以TSC的质量浓度(x)对抑制率(y)进行回归分析,得回归方程为 $y = 18.246 - 0.012x + 7.421 \times 10^{-5}x^2 - 2.5 \times 10^{-8}x^3$ ($r^2 = 0.996, P < 0.01$),计算得IC₅₀为911.0 mg/L。

3.2 细胞凋亡率的测定结果

911.0 mg/L的TSC作用于细胞24、48、72 h后细胞凋亡率分别为21.10%、30.20%、41.10%。随作用时间的延长,各时间

表1 TSC对SMMC-7721细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Effects of TSC on the proliferation of SMMC-7721 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

TSC,mg/L	A	抑制率, %
0(空白对照)	0.095 ± 0.075	0
100	0.698 ± 0.028*	17.76
200	0.688 ± 0.070*	19.11
400	0.667 ± 0.072*	21.88
600	0.583 ± 0.031*	33.25
800	0.487 ± 0.075*	46.12
1 000	0.452 ± 0.039*	50.83
1 200	0.331 ± 0.035*	68.13
1 400	0.244 ± 0.043*	79.63
1 600	0.201 ± 0.034*	85.31
1 800	0.162 ± 0.035*	90.50
2 000	0.162 ± 0.031*	90.30

注:与空白对照比较, *P<0.05

Note: vs. blank control group, *P<0.05

点的细胞凋亡率均增加,差异具有统计学意义(P<0.05),表明TSC对SMMC-7721细胞的促凋亡作用与作用时间呈正相关。TSC对SMMC-7721细胞的凋亡图见图1,柱状图见图2。

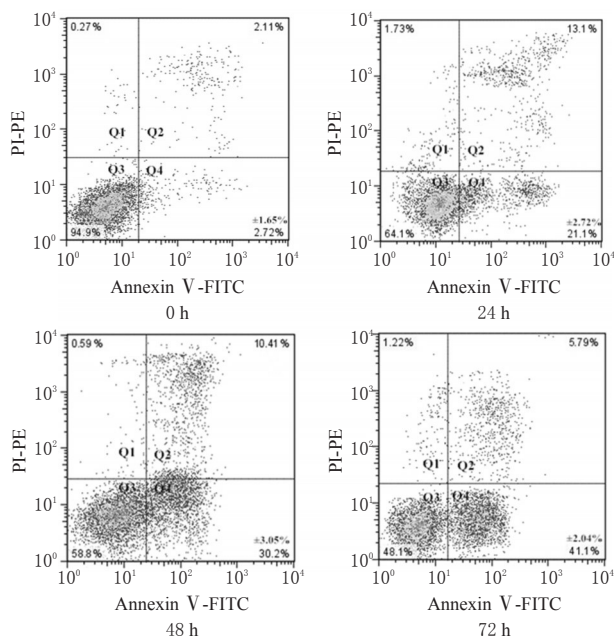


图1 TSC作用不同时间后SMMC-7721细胞的凋亡图

Fig 1 Apoptosis figure of TSC-SMMC-7721 cell after different time

3.3 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9活性的检测结果

与空白对照比较,200、400、800、1 000 mg/L的TSC能增强细胞中Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9活性,差异具有统计学意义(P<0.01或P<0.05),且与给药浓度呈正相关。各组细胞中Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9活性比较见表2。

3.4 p38MAPK和p53蛋白表达的检测结果

与空白对照比较,200、400、800、1 000 mg/L的TSC能增强细胞中p38MAPK、p53蛋白表达,差异具有统计学意义(P<0.05),且与给药质量浓度呈正相关。各组细胞中p38MAPK和

p53蛋白表达水平比较见表3。

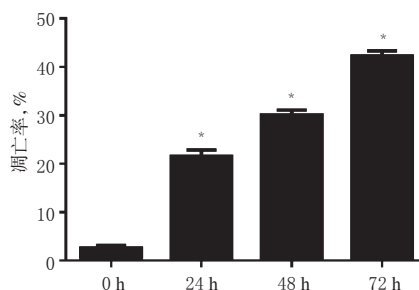


图2 TSC作用不同时间后SMMC-7721细胞凋亡的柱状图

注:与0 h比较, *P<0.05

Fig 2 Histogram of TSC-SMMC-7721 cell apoptosis after different time

Note: vs. 0 h, *P<0.05

表2 各组细胞中Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9活性比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Comparison of the activities of Caspase-3, Caspase-8 and Caspase-9 in cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

TSC,mg/L	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
0(空白对照)	0.035 ± 0.027	0.043 ± 0.032	0.083 ± 0.037
200	0.975 ± 0.215*	0.862 ± 0.092*	1.723 ± 0.172*
400	1.264 ± 0.532**	1.432 ± 0.123*	1.957 ± 0.215*
800	1.635 ± 0.145**	1.782 ± 0.152*	2.327 ± 0.242*
1 000	1.856 ± 0.121**	1.978 ± 0.213*	2.895 ± 0.321*

注:与空白对照比较: *P<0.05, **P<0.01

Note: vs. blank control group, *P<0.05, **P<0.01

表3 各组细胞中p38MAPK和p53蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Comparison of protein expression level of p38MAPK and p53 in cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

TSC,mg/L	p38MAPK	p53
0(空白对照)	0.046 ± 0.037	0.062 ± 0.044
200	0.213 ± 0.019*	0.135 ± 0.021*
400	0.421 ± 0.045*	0.621 ± 0.051*
800	0.725 ± 0.082*	0.812 ± 0.092*
1 000	0.952 ± 0.121*	1.371 ± 0.132*

注:与空白对照比较, *P<0.05

Note: vs. blank control group, *P<0.05

4 讨论

随着医学研究的不断深入,人们已经认识到诱导肿瘤细胞凋亡可能为肿瘤治疗提供新的思路和靶点^[13]。基于传统中医药基础理论,将传统中医药与现代分子生物学结合,对现代化中医药研究具有十分重要的意义^[14]。本研究发现,TSC作为党参抗肿瘤的活性成分,体外对SMMC-7721细胞具有较好的增殖抑制作用,IC₅₀为911.0 mg/L,并且促凋亡作用呈明显的浓度依赖性,显示出较好的体外抗肿瘤活性。本试验采用较为客观的流式细胞法,通过Annexin V/PI双染法将早期凋亡、晚期凋亡及坏死细胞区别开,并计算出各自的百分比^[15]。结果显示,肿瘤细胞凋亡率随着TSC质量浓度的增加而升高,呈一定的浓度依赖性,这表明TSC具有诱导SMMC-7721细胞凋亡的

作用。

Caspase 蛋白水解系统是参与细胞凋亡的重要组成部分,可以通过两种途径激活 Caspase,一是线粒体途径,二是死亡受体途径^[6]。Caspase-8 是死亡受体途径中的关键性起始 Caspase,其被激活之后进一步裂解和活化 Caspase-3,从而诱导癌细胞凋亡。Caspase-9 是线粒体途径中的关键蛋白酶,处在 Caspase 瀑布式活化的顶端,与细胞凋亡的关系最为密切,是细胞凋亡信号转导途径中最关键的酶^[7]。本文研究发现,TSC 作用于 SMMC-7721 细胞后 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 活性明显增加($P < 0.05$),且基本上与细胞凋亡同步。研究证实,细胞坏死时并不激活 Caspase-3,其通常被当作细胞凋亡的检测指标。所以 Caspase-3 活性的明显增强,进一步证实了 TSC 所诱导的 SMMC-7721 细胞死亡方式为凋亡。TSC 可通过激活线粒体途径和死亡受体途径,引起 Caspase 家族的级联效应,促使 SMMC-7721 细胞凋亡的发生。

在肿瘤细胞中,活化的 p38MAPK 可增强 p53 表达,p53 能抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 等的表达^[8],同时能促进线粒体释放细胞色素 C (CytoC),进而激活 Caspase 级联反应,最终作用于 Caspase-3,导致细胞凋亡^[9]。本研究结果表明,TSC 能上调 SMMC-7721 细胞中 p53 和 p38MAPK 蛋白的表达,并且在 72 h 内对 p53 和 p38MAPK 蛋白水平的上调是以浓度依赖的方式进行的。这可能就是因为 p38MAPK 信号通路被激活,从而引起 p53 的表达增加,p53 通过转录途径引起了细胞凋亡。

综上所述,TSC 可明显抑制 SMMC-7721 细胞增殖,其通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用。作为一种新型抗肿瘤中药活性成分,TSC 将具有良好的应用前景。因此,笔者将对其抗肿瘤作用及作用机制进一步深入研究。

参考文献

[1] Smith WA, Li C, Nottage KA, et al. Lifestyle and metabolic syndrome in adult survivors of childhood cancer: a report from the St. jude lifetime cohort study[J]. *Cancer*, 2014, 120 (17): 2 742.

[2] 陈万青,张思维,曾红梅,等.中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡[J].*中国肿瘤*, 2014, 23(1): 1.

[3] 任风鸣,谢贤明,章文伟,等.不同产地川党参质量评价研究[J].*实用中医药杂志*, 2014, 3(3): 241.

[4] 彭锐,马鹏,莫让瑜,等.川党参药材质量标准研究[J].*世界科学技术: 中医药现代化*, 2014, 6(3): 578.

[5] 辜鹏程,方志娥,尚京川.超声提取党参总皂苷的工艺[J].*光谱实验学*, 2012, 7(4): 2 235.

[6] 陈克克.中药党参的研究概况[J].*西安文理学院报*, 2008,

4(2): 33.

[7] 冯佩佩,李忠祥,原忠.党参属药用植物化学成分和药理研究进展[J].*沈阳药科大学学报*, 2012, 4(4): 307.

[8] 蒋小飞,张宝顺.党参总皂苷的提取、分离和纯化[J].*安徽农业科学*, 2011, 39(4): 2 061.

[9] 周波林.中药有效成分调控 Bcl-2 基因抗器官缺血-再灌注损伤的研究进展[J].*中国药房*, 2014, 25(15): 1 433.

[10] 陈恒冲,贾超,马彬峡,等.轮叶党参质量标准研究[J].*中国药房*, 2010, 21(23): 2 172.

[11] 俞星,李林,韩春姬,等.轮叶党参总皂苷对 HepG2 细胞凋亡的作用[J].*吉林大学学报*, 2011, 11(6): 1 091.

[12] 俞星,韩春姬,朴惠善,等.党参皂苷 D 对 HepG2 细胞增殖时间效应和细胞周期的影响[J].*吉林大学学报*, 2012, 3(2): 236.

[13] 王俊淇,邸维霞,周国林,等.党参皂苷及党参脂抗肿瘤与抗菌实验研究[J].*中兽医医药杂志*, 1999, 18(1): 11.

[14] 张壮,闫彦芳,韦颖,等.党参皂苷 L1 抗缺氧缺糖再给氧诱导大鼠皮质神经细胞凋亡的作用[J].*中国临床康复*, 2005, 9(1): 131.

[15] Philchenkov AA. Apoptosis-reactivating agents for targeted anticancer therapy[J]. *Biomed Khim*, 2013, 59(2): 119.

[16] Mandal R, Raab M, Matthes Y, et al. pERK 1/2 inhibit caspase-8 induced apoptosis in cancer cells by phosphorylating it in a cell cycle specific manner[J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(2): 232.

[17] Malekinejad H, Moradi M, Fink-Gremmels J, et al. Cytochrome c and caspase-3/7 are involved in mycophenolic acid-induced apoptosis in genetically engineered PC12 neuronal cells expressing the p53 gene[J]. *Iran J Pharm Res*, 2014, 13(1): 191.

[18] Mishra R, Karande AA. Endoplasmic reticulum stress-mediated activation of p38 MAPK, caspase-2 and caspase-8 leads to abrin-induced apoptosis[J]. *Plos One*, 2014, 9(3): e92 586.

[19] Kupper DS, Valera FC, Malinsky R, et al. Expression of apoptosis mediators p53 and caspase 3, 7, and 9 in chronic rhinosinusitis with nasal polyposis[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2014, 28(3): 187.

(收稿日期:2014-10-11 修回日期:2014-12-15)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅